



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA  
"ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES"

ESTUDIO MOLECULAR DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS EN  
PACIENTES CON GASTROSQUISIS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARTÍNEZ JUÁREZ ALEJANDRO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUÍZ



INPer

MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	
<b>1.1. Defectos Congénitos.</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Defectos Congénitos de la Pared Abdominal.</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Gastrosquisis.</b>	
<b>1.3.1. Definición.</b>	<b>8</b>
<b>1.3.2. Mecanismo de origen.</b>	<b>8</b>
<b>1.3.3. Epidemiología.</b>	<b>10</b>
<b>1.3.4. Factores de Riesgo Asociados.</b>	<b>11</b>
<b>1.3.5. Factores Genéticos.</b>	<b>13</b>
<b>1.4. Síndromes de Genes Contiguos.</b>	<b>14</b>
<b>1.5. Métodos de Identificación de Aneusomías Segmentales.</b>	<b>15</b>
<b>2. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO.</b>	
<b>2.1. Objetivos.</b>	<b>19</b>
<b>2.2. Hipótesis.</b>	<b>19</b>
<b>2.3. Diseño del estudio.</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	
<b>3.1. Universo.</b>	<b>19</b>
<b>3.2. Unidades de observación.</b>	<b>20</b>
<b>3.3. Método de muestreo.</b>	<b>20</b>
<b>3.4. Tamaño de la muestra.</b>	<b>20</b>
<b>3.5. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.</b>	<b>20</b>
<b>3.6. Variables en estudio.</b>	<b>21</b>

<b>3.7. Obtención de datos.</b>	<b>22</b>
<b>3.7.1. Extracción de DNA.</b>	<b>23</b>
<b>3.7.2. Metodología de la prueba de microarreglos.</b>	<b>26</b>
<b>3.8. Análisis de los microarreglos.</b>	<b>33</b>
<b>4. RESULTADOS.</b>	
<b>4.1. Descripción de la muestra de estudio.</b>	<b>34</b>
<b>4.2. Estudio de Microarreglos.</b>	<b>35</b>
<b>5. DISCUSIÓN.</b>	<b>40</b>
<b>6. CONCLUSIONES.</b>	<b>46</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>47</b>

## **1. INTRODUCCIÓN.**

### **1.1. Defectos Congénitos**

Los defectos congénitos (DC) son alteraciones morfológicas de órganos o tejidos que se originan por diversos mecanismos etiopatogénicos y que se encuentran presentes al nacimiento, sean evidentes o no. [1] Ocupan un lugar preponderante en la patología humana, tanto por su relativa frecuencia como por sus repercusiones funcionales, estéticas, psicológicas, sociales y económicas. La severidad de los DC es variable y va desde hallazgos morfológicos que no causan serias consecuencias médicas o estéticas (DC menores), hasta la alteración severa de la forma de los órganos y/o partes del cuerpo con consecuencias médicas o estéticas que requieren de tratamiento médico o quirúrgico para restituir la salud o salvar la vida del paciente (DC mayores). La frecuencia de los DC externos en la mayoría de las poblaciones estudiadas es de alrededor de 12% en recién nacidos muertos (RNM) y de 2% en recién nacidos vivos (RNV). Esta última cifra se eleva aproximadamente a 2.5% si se incluyen los defectos internos identificados al nacimiento y hasta 10% si se incluyen los defectos detectados durante el seguimiento hasta los cinco años de edad. En los países desarrollados, los DC o sus complicaciones causan aproximadamente el 25% de las muertes durante la infancia y un 60% de las camas en hospitales pediátricos están ocupadas por niños internados para tratamiento quirúrgico de éstas. En países en vías de desarrollo, como el nuestro, se espera que en la medida en que mejoren el nivel socioeconómico y cultural de la población y la cobertura de los servicios de salud, se observe un aumento relativo en la proporción de muertes debidas a DC y de la tasa de morbilidad por aumento en la sobrevivencia de los RN malformados.[2]

Con base en el momento en que se presenta su factor causal, los DC se clasifican en: malformación, deformación y disrupción. Se considera que un DC es una malformación cuando existe evidencia suficiente para concluir que fue causado por una alteración intrínseca del desarrollo embrionario o fetal, que condicionó la detención, retraso o desviación en la formación de algún órgano o sistema en particular, resultando en una modificación permanente de su estructura. Por el contrario, una deformación es causada por fuerzas mecánicas extraembrionarias (p.e. como una pelvis materna estrecha, oligohidramnios o alteraciones estructurales en el útero de la madre) que modifican, por moldeamiento, estructuras fetales que tuvieron un desarrollo intrínseco normal, principalmente estructuras esqueléticas del segmento corporal involucrado. En el caso de una disrupción, existe la destrucción de tejido previamente normal y completamente formado, como resultado de factores mecánicos u otros fenómenos más complejos, tales como isquemia, hemorragia o adhesión entre superficies no epitelizadas, por lo que frecuentemente se encuentran afectados los diferentes tejidos de una sola región anatómica bien delimitada. [1, 3-5]

De acuerdo a si un individuo presenta un solo defecto o un conjunto de ellos, los DC pueden clasificarse como aislados o múltiples, respectivamente. Los DC aislados suelen afectar un solo órgano y la afectación sobre éste puede ser simple (p.e. atresia anal) o compleja (p.e. cardiopatía con varias estructuras intracardiacas involucradas). Sin embargo, en algunas ocasiones, los DC aislados pueden afectar más de un órgano (p.e. fístula traqueoesofágica, persistencia de cloaca).[1, 4, 5]

Para el caso de los DC múltiples, su presencia simultánea puede clasificarse en alguno de los siguientes patrones de presentación: síndrome, secuencia, asociación y

por azar. El término *síndrome* se utiliza cuando una determinada combinación de DC ocurre de manera repetida en un patrón consistente, usualmente originada por el mismo factor etiológico, con una historia natural similar y un riesgo de recurrencia conocido. El término *secuencia* implica que un único defecto o factor mecánico primario inició una serie de eventos que condujeron al desarrollo de otros defectos del mismo u otro sistema o área corporal. Una asociación se refiere a una entidad en la cual dos o más DC ocurren juntos en un patrón consistente, con mayor frecuencia que la esperada sólo por azar, pero para la cual aún no se tiene una etiología bien definida. Finalmente, cuando dos o más DC se presentan simultáneamente sin existir un mecanismo patogénico o una topología en común y su presentación sólo se ha reportado de manera esporádica, se puede concluir que se trató de una presentación coincidente por azar.[1, 4]

## **1.2. Defectos Congénitos de la Pared Abdominal**

Los defectos de la pared abdominal constituyen un grupo frecuente de anomalías que afectan al feto, con una prevalencia de 1 de cada 2,000 nacidos vivos. La gastrosquisis y el onfalocele constituyen los dos defectos más frecuentes de este grupo.[6]

En general, estos defectos se producen en etapas tempranas del desarrollo, desde finales de la tercera y hasta la décima semana, cuando ocurre la formación de la pared abdominal anterior, la remodelación del cordón umbilical y una parte importante del desarrollo del intestino medio. Los cambios embrionarios involucrados en estos fenómenos se resumen a continuación y se ilustran en las figuras 1 y 2.

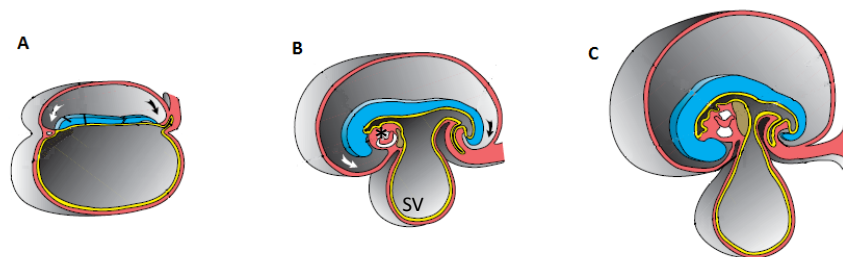
- Pliegue craneal: El segmento más cefálico del embrión trilaminar se dobla ventralmente. Con esto, el corazón y el septo transversal, que inician su formación en posición extraembrionaria, inmediatamente por delante del

borde anterior del disco trilaminar, se trasladan hasta la futura cavidad torácica, en la cara embrionaria anterior, quedando ahora el corazón inmediatamente por encima del septo transverso. Este último se integrará más adelante al diafragma para formar su porción más ventral, sobre la línea media.

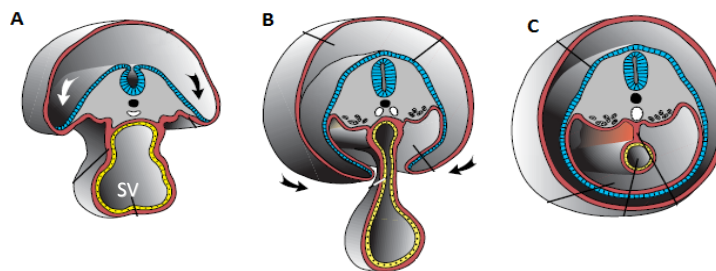
- **Pliegue caudal:** Comprende la flexión de la porción caudal del disco trilaminar, con la cual el tallo corporal, que es un puente de tejido que conecta al mesodermo intraembrionario con el mesodermo extraembrionario, localizado en el extremo más caudal del embrión, se desplaza hasta llegar a la parte media del mismo en su pared anterior, para integrar posteriormente el principal componente del cordón umbilical.
- **Pliegues laterales:** Las partes laterales del embrión trilaminar se pliegan medialmente, cambiando el aspecto aplanado del disco embrionario a una forma algo cilíndrica. A nivel torácico, estos pliegues producen que el corazón se incorpore al interior del tórax. En la parte media del embrión (futura región abdominal), los pliegues laterales van disminuyendo la comunicación entre el intestino medio y el saco vitelino, el cual queda finalmente incorporado dentro del tallo de fijación. La unión del tallo de conexión con el tallo vitelino forma el cordón umbilical a las 5 o 6 semanas postconcepcionales. A medida que se forma el cordón umbilical, la fusión ventral de los pliegues laterales reduce la zona de comunicación entre los celomas intra y extraembrionarios hasta cerrarla por completo aproximadamente a la décima semana del desarrollo. Posteriormente, la rápida expansión de la cavidad amniótica oblitera el celoma extraembrionario y forma la cubierta epitelial para el cordón umbilical.



- Desarrollo extraembrionario del intestino medio: A las 6 semanas postconcepcionales, la rápida elongación del intestino medio forma un asa que se hernia en el interior de la base del cordón umbilical. Esta migración fisiológica del intestino se produce por la falta de espacio intraabdominal, pues el abdomen es ocupado principalmente por el hígado y los riñones relativamente grandes. Durante la décima semana postconcepcional los intestinos retornan rápidamente hacia el abdomen.[6-8]



**Fig. 1.** Vista lateral de un embrión trilaminar (corte sagital, a la izquierda se observa el extremo cefálico del embrión y a la derecha el extremo caudal. Se indica el plegamiento craneal (flecha blanca) y el plegamiento caudal (flecha negra). **A.** Final de la tercera semana del desarrollo. El embrión trilaminar se encuentra completamente extendido. **B.** Inicio de la cuarta semana. El pliegue cefálico sitúa al área cardíaca (\*) en posición intratorácica. El saco vitelino (SV) se encuentra ampliamente comunicado con el intestino embrionario a través de un tallo ancho. **C.** Final de la cuarta semana. Se han completado los pliegues cefálico y caudal. El saco vitelino se comunica con el intestino embrionario por un tallo estrecho, el cual queda limitado hacia la porción cefálica por la futura pared abdominal superior (epigastrio) y hacia la porción caudal por la futura pared abdominal inferior (hipogastrio).



**Fig. 2.** Vista cefálica de un embrión trilaminar (corte transversal). Se ilustra el plegamiento lateral derecho (flecha blanca) y el plegamiento lateral izquierdo (flecha negra). **A.** Final de la tercera semana del desarrollo. El saco vitelino (SV) se comunica con el intestino embrionario por un tallo ancho **B.** Final de la cuarta semana. Los pliegues laterales se aproximan entre sí hacia la porción ventral del embrión para formar la pared toracoabdominal. El saco vitelino se comunica con el intestino embrionario mediante un tallo estrecho. **C.** Final de la sexta semana. Los pliegues laterales del embrión se han fusionado sobre la línea media anterior, quedando formada la pared corporal anterior o ventral.

La evidencia de que estos fenómenos ocurren en el embrión humano de la misma manera que en los modelos animales en los que han sido descritos aún es insuficiente, pero ha servido para generar hipótesis sobre el origen de los diferentes defectos de la pared abdominal. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados hasta el momento, aún se carece de información contundente sobre la fisiopatología de cada uno de estos defectos. En la figura 3 se muestran los principales defectos de la pared abdominal y en la tabla A se resumen sus características, así como la teoría más aceptada sobre su mecanismo de origen.[4, 6]

Los hallazgos ecográficos prenatales que presentan los distintos defectos de pared abdominal son bastante diferentes, y en la mayoría de los casos permiten diferenciarlos de manera confiable, lo cual resulta importante debido a que estos trastornos difieren claramente en cuanto a sus hallazgos anatomopatológicos característicos, la frecuencia de anomalías asociadas y su pronóstico.



**Figura 3.** Principales defectos del desarrollo la pared abdominal.  
A. Gastrosquisis. B. Onfalocele. C. Hernia umbilical. D. Pentalogía de Cantrell. E. Complejo pared-miembro. F. Extrofia vesical.

**Tabla A. Principales Defectos de Pared Abdominal**

<b>Tipo de defecto</b>	<b>Descripción</b>	<b>Fisiopatología principalmente aceptada</b>
Gastrosquisis	Defecto paraumbilical con protrusión de material abdominal sin membrana que lo recubra.	Involución anómala de la vena umbilical derecha / Disrupción de la arteria onfalomesentérica derecha
Onfalocele	Defecto sobre la línea media con protrusión de material abdominal recubierto por membrana amniótica	Falta del retorno de las asas intestinales a la cavidad corporal posiblemente secundario a falla de la expansión de la cavidad abdominal.
Hernia umbilical congénita	Defecto sobre la línea media con protrusión de material abdominal recubierto por piel	Falla del cierre del anillo umbilical por retraso en el desarrollo del músculo recto del abdomen
Pentalogía de Cantrell	Presencia simultánea de onfalocele, hernia diafragmática anterior, defecto esternal caudal, defecto pericárdico y defecto cardíaco	Aplasia del septo transverso
Complejo pared-miembro	Defecto habitualmente amplio que afecta tanto tórax como abdomen, con órganos eviscerados forman una masa de aspecto abigarrado. Frecuentemente asociado con defectos craneales y anomalías transversas de las extremidades.	Disrupción por bandas amnióticas
Extrofia vesical	Exteriorización de la vejiga que queda expuesta a nivel abdominal inferior.	Insuficiencia de tejido mesodérmico de los pliegues laterales en su porción caudal

### **1.3. Gastrosquisis**

#### **1.3.1. Definición**

La gastrosquisis (GQ) es un defecto congénito de la pared abdominal con eventración del contenido abdominal y sin la presencia de un saco o membrana que lo recubra, localizado con mayor frecuencia a la derecha del cordón umbilical. Tradicionalmente ha sido considerada una disrupción; sin embargo, evidencia reciente sugiere que este defecto podría ser una malformación debida a una anomalía intrínseca del desarrollo de la pared abdominal embrionaria. [9]

#### **1.3.2. Mecanismo de origen**

A pesar de que el mecanismo de cierre de la pared embrionaria ventral aún no está del todo comprendido, se han propuesto cuatro mecanismos para explicar el origen de la GQ:

- 1) Falla en la diferenciación del mesénquima somatopleural, debido a la acción de algún teratógeno durante la cuarta semana postconcepción;
- 2) Ruptura de la membrana amniótica en la base del cordón umbilical durante el tiempo de la herniación fisiológica por un retraso en el cierre del anillo umbilical;
- 3) Involución anormal de la vena umbilical derecha, lo que impediría el crecimiento y la viabilidad del mesénquima circundante, resultando en un defecto de la formación de la pared en el área paraumbilical;

- 4) Disrupción de la arteria onfalomesentérica, produciendo infarto y necrosis de la base del cordón.

Cada una de estas hipótesis tiene sus limitaciones. La primera, no propone el tipo de agresión ni el mecanismo por el cual se produce el defecto. La segunda, no cuenta con una base embriológica o patológica que explique cómo podría ocurrir dicha ruptura y cómo ésta podría debilitar una pared abdominal intacta. La tercera, no considera que la irrigación del mesénquima en la pared abdominal no depende de las venas umbilicales y que, además, la irrigación de la piel en la región paraumbilical proviene simultáneamente de otras fuentes, las cuales permanecerían intactas a pesar de la lesión en las venas umbilicales. La cuarta hipótesis tiene dos limitantes principales: primero, las arterias onfalomesentéricas se forman a partir de un complejo de múltiples vasos cuyas diferentes ramas coalescen para formar la arteria celiaca y las mesentéricas (superior e inferior); por lo que, con tantos vasos, sería difícil explicar por qué solo uno en el lado derecho es más sensible al infarto; segundo, dichas arterias no irrigan la piel o la pared abdominal en esta región. El aporte sanguíneo de la pared abdominal ocurre a través de las arterias intersegmentarias anteriores, las cuales surgen a cada lado de la cara dorsolateral de la aorta hacia la región paraumbilical, forman una fina red de vasos sanguíneos ramificados y terminan centralmente anastomosándose sobre la línea media. Por lo tanto, cualquier disrupción vascular que involucre a las arterias onfalomesentéricas se esperaría que resultara en la necrosis de diferentes regiones del intestino, mas no de la pared abdominal. Hasta el momento no existe evidencia sólida que apoye las hipótesis mencionadas, por lo que recientemente se ha propuesto que la GQ podría considerarse como una malformación de la pared abdominal más que como una disrupción. [10-12]

### **1.3.3. Epidemiología**

Con relación a sus características epidemiológicas de GQ, Mastroiacovo et al. (2006) reportó una variabilidad considerable en la prevalencia de este DC entre distintos países del mundo, encontrando la más alta en México y la más baja en la República Eslovaca durante los tres años más recientes de su estudio.[13] En Estados Unidos, los estudios más recientes indican una prevalencia por 10,000 nacimientos de 4.6 en Atlanta, 4.49 en Carolina del Norte, y 3.92 en Utah. [14-16] En México, para el año 2005 se reportó una prevalencia por 10 000 nacimientos de 5.77.[17]

A diferencia de la mayoría de los defectos congénitos, la prevalencia de GQ ha aumentado en los últimos años en muchas partes del mundo.[15, 16, 18-31] Este incremento es más aparente entre el grupo de mujeres más jóvenes [29, 32] y aún no se ha identificado una posible explicación o una causa específica. Solo en unas cuantas poblaciones no se ha encontrado dicha tendencia a través del tiempo. [14, 33]

Las series más grandes indican que la GQ ocurre más frecuentemente como un defecto aislado; a pesar de ello, se han reportado otros defectos asociados en 16% a 21% de los pacientes. [34, 35] Hsu et al. (2002) reportaron otros defectos en 35% de los casos; sin embargo, debido a que varios de los defectos en esta serie de casos fueron presumiblemente secundarios a la GQ (p.e. atresia intestinal), se estima que la proporción con defectos no relacionados fue de aproximadamente 11%. [36] Kunz et al. (2005) reportaron que el 11% de los casos de menores de 5 años con GQ tenían una cardiopatía congénita, 23% de los cuales tenían más de una lesión cardíaca. [37] En la literatura internacional se encuentran reportes de GQ que han ocurrido de manera

simultánea con las siguientes alteraciones: síndrome de Hanhart (hipogénesis oromandibular y de extremidades) [38], aganglionosis total de colon y parcial de intestino delgado [39], atresia biliar extrahepática [40], artrogriposis [41, 42] y artrogriposis con hipoplasia de miembros y de pared torácica con anomalías de la expresión facial. [43] Además, la GQ ha sido reportada en casos de trisomía 13 y 18 [14, 44], trisomía 21 y en un caso de mosaicismo no especificado. [44] Hougland et al. (2005) reportaron que el 3.7% de las GQ en su serie de casos de fuente hospitalaria eran cromosómicos o sindrómicos pero no especificaron más datos.[16] En contraste, Martínez-Frías et al. (1990) no observaron GQ en casos de síndromes monogénicos pero sí en dos casos como parte de alteraciones congénitas múltiples de etiología desconocida, uno de los cuales podría tratarse de un complejo pared miembro.[45]

La proporción de sexos (masculino/femenino) en pacientes con GQ varía entre los grupos estudiados, entre 1.0 y 1.44. [16, 19, 31, 34, 36, 44, 46] La variación en esta característica podría estar condicionada por la selección de los casos estudiados en cada serie (nacidos vivos, óbitos, interrupciones del embarazo y abortos espontáneos), por una mejor supervivencia determinada por el sexo o por una mayor incidencia del defecto en varones.

#### **1.3.4. Factores de Riesgo Asociados**

En las últimas dos décadas, muchos estudios epidemiológicos se han enfocado al análisis de exposiciones que pudieran influenciar la actividad vascular o que pudieran ser más prevalentes entre las madres de RN con GQ. Hasta el momento se han descrito asociaciones con tabaquismo [35, 46-50], ingesta de aspirina [48, 51, 52], pseudoefedrina, fenilpropilamina, acetaminofen, ibuprofeno [51, 52] y alcohol [35,

53] y uso de drogas ilícitas [35, 54, 55]; sin embargo, la evidencia que se tiene de estos agentes como posibles factores de riesgo ha sido inconsistente. Por el contrario, en diversos estudios se ha demostrado de manera constante una correlación inversa entre el riesgo para GQ y la edad materna. El riesgo es mayor para aquellas mujeres menores a 20 años de edad [14, 15, 18-20, 22, 28, 31, 44, 46, 47, 53, 56, 57]. La razón de esta asociación no ha sido explicada hasta el momento, pero se piensa que podría relacionarse con exposiciones ambientales comunes entre este grupo de edad. En este sentido, Torfs et al. (1994) identificó que las madres jóvenes de nivel socioeconómico bajo, en combinación con abuso de sustancias, tuvieron un mayor riesgo de tener descendencia con GQ.[35]

Debido a que se ha observado que la GQ ocurre con mayor frecuencia en madres jóvenes, la nutrición ha sido un foco de atención en algunas investigaciones. Torfs et al. (1998) reportaron una reducción en nutrientes específicos, carotenoides y glutatión total y un incremento en nitrosaminas como factores de riesgo para GQ. Por otra parte, Lam et al. (1999) encontraron que un Índice de Masa Corporal (IMC) en su cuartil más bajo, el cual es una medida aproximada de malnutrición, también resultó un factor de riesgo para descendientes con esta enfermedad. Asimismo, se ha reportado que la exposición intensa a monóxido de carbono, estimada por fumar cigarrillos o marihuana previo al embarazo y un IMC bajo (<22kg/m<sup>2</sup>) en combinación con ingesta baja de proteínas o zinc (otro indicador de malnutrición), incrementan substancialmente el riesgo para GQ. [50]



### 1.3.5. Factores Genéticos

En la literatura internacional se han reportado numerosos casos familiares con GQ. Kohl et al. [58] publicaron recientemente una revisión sobre los casos de GQ con recurrencia familiar. En ella se reportaron 38 casos con algún otro familiar afectado. Entre ellos, se identificaron 30 familiares de primer grado, 24 de los cuales fueron hermanos. Éstos incluyeron 8 parejas de gemelos que fueron concordantes para GQ, dos de los cuales fueron gemelos acoplados. Otros familiares de primer grado afectados con GQ incluyeron 2 parejas de medios hermanos que compartían la misma madre y dos parejas de medios hermanos que compartían el mismo padre. También se identificaron 2 casos de madre e hijo afectados. La afectación de familiares de segundo grado o mayor se detectó en 8 ocasiones y comprendió 4 parejas de primos hermanos, 2 parejas de primos segundos, 1 tía paterna y su sobrina, y un tío abuelo y su sobrino. [58] Además de estos reportes de casos, recientemente Torfs et al. (2006) demostraron una asociación entre la presencia de algunos polimorfismos génicos (ICAM-1 gly214arg, NOS3 glu298asp, NPPA T2238C, ADD1 gly460trp) y un riesgo incrementado para GQ. [59] Dos de ellos (NPPA T2238C, ADD1 gly460trp) además mostraron una asociación significativamente mayor en estado homocigoto, y tres de ellos (ICAM-1 gly214arg, NOS3 glu298asp, NPPA T2238C) un riesgo mayor cuando coincidieron con el antecedente de tabaquismo materno, sugiriendo una interacción gen-ambiente relacionada con la etiología vascular de la GQ. [59]

En conjunto, estos reportes sugieren claramente la participación de factores genéticos en algunos casos de GQ.

#### 1.4. Síndromes de Genes Contiguos

Los síndromes de genes contiguos (SGC), también denominados síndromes por aneusomía segmental, son enfermedades causadas por deleciones o duplicaciones cromosómicas no detectables mediante técnicas de citogenética convencional (incluso cariotipo de alta resolución), debido a que el segmento involucrado generalmente es menor a 5Mb. Estos rearrreglos también reciben el nombre de microdeleciones o microduplicaciones. A pesar de su tamaño, el segmento involucrado puede contener múltiples genes, algunos de los cuales son sensibles a dosis y pueden contribuir a la generación de un fenotipo específico.[60, 61]

Para la mayoría de los loci autosómicos, la deleción causa una reducción de la dosis génica (haploinsuficiencia) que produce una monosomía estructural y funcional. Por ejemplo, se han identificado genes con haploinsuficiencia en la del(7)(q11.23q11.23) en el síndrome de Williams, para la del(8)(q24.1-q24.1) en el síndrome de Langer-Giedion, para la del(17)(p13.3) en el síndrome de Miller-Dieker, y para la del(22)(q11.2q11.2) en los síndromes de DiGeorge y velocardiofacial. [62, 63]

En algunos casos, la monosomía estructural de una región particular puede producir una nulisomía funcional. Tal es el caso de las microdeleciones para las cuales existen genes con impronta o con mutaciones puntuales en la contraparte no deletada (los cuales son funcionalmente inactivos).[64]

En contraparte, la duplicación de segmentos cromosómicos causa un incremento en la dosis y la expresión génicas, las cuales se han asociado con alteraciones específicas en la organogénesis y la función de algunos tejidos. Por ejemplo, el síndrome de Beckwith-Wiedemann puede estar causado por

microduplicación paterna de 11p15.5 y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 1A por microduplicación en la región 17p12.[63, 65].

Una característica común a los SGC es su expresividad extremadamente variable. Las consecuencias fenotípicas en diferentes individuos con una misma aneuploidía segmental pueden variar desde un cuadro clínico característico hasta la identificación asintomática de la alteración citogenética, pasando por la presencia de solo uno de los defectos descritos para el síndrome en cuestión. El tamaño de la aneuploidía segmental, la cantidad de genes involucrados, la integridad y actividad de los genes homólogos, así como su interacción con otros genes en distintas partes del genoma pueden explicar la variabilidad en sus efectos fenotípicos. Las deleciones y duplicaciones involucradas en SGC pueden variar en tamaño desde unos cientos de kilobases (Kb) hasta varias megabases (Mb), aún dentro del mismo síndrome. Estos desbalances podrían involucrar entre 10 a 100 genes, de los cuales, solo aquellos sensibles a dosis o con impronta contribuirían principalmente al fenotipo anormal. Por todo ello, existe la posibilidad de que ciertos defectos congénitos, sindrómicos y no sindrómicos, puedan estar asociados con aneuploidías segmentales aún no caracterizadas.[64, 66]

### **1.5 Métodos de identificación de Aneuploidías Segmentales**

Los desbalances genómicos menores a 5Mb son extremadamente difíciles de detectar mediante análisis citogenético convencional. Una metafase típica contiene aproximadamente 400 a 500 bandas por set haploide; con este nivel de condensación cromosómica sólo las deleciones o duplicaciones de más de 10 Mb pueden ser detectadas con relativa facilidad utilizando citogenética convencional. En casos

particulares pueden utilizarse técnicas de bandeado de alta resolución, las cuales pueden alcanzar aproximadamente las 1000 bandas por set haploide, con lo que es posible identificar de manera confiable alteraciones de entre 3 a 5 Mb; sin embargo, se requiere de procedimientos más laboriosos que no forman parte de los procesamientos habituales en un laboratorio de genética clínica.[67]

Para superar algunas de éstas limitantes y poder detectar alteraciones submicroscópicas con mayor facilidad y certeza, se han desarrollado nuevas técnicas de análisis cromosómico. A partir de la década de los 80s se desarrollaron diferentes métodos de hibridación no isotópica *in situ* para detectar alteraciones microscópicas pequeñas y submicroscópicas. De éstos, el más usado en la actualidad es el FISH (Fluorescent In Situ Hybridization). En este método, un fragmento pequeño de DNA (habitualmente entre 60 y 450 kb) es marcado con fluorescencia y usado como sonda para hibridar con alguna región específica entre los cromosomas del sujeto en estudio. Esto permite la determinación del número y la localización de secuencias específicas de DNA, tanto en cromosomas en metafase como en núcleos en interfase, mediante métodos de evaluación más simples que los del bandeado de alta resolución. Existen diversos tipos de sondas de FISH para investigar segmentos específicos del genoma; para la identificación de deleciones o duplicaciones asociadas con síndromes de genes contiguos se pueden utilizar sondas de secuencia única con locus específico; sin embargo, el uso correcto del FISH para estos fines depende de que el sujeto de estudio presente características físicas altamente sugerentes de un síndrome clínicamente reconocible para el cual se haya demostrado su asociación con un desbalance genómico previamente caracterizado. También existen sondas para examinar de manera simultánea las regiones teloméricas de los cromosomas, permitiendo un

aumento en la resolución del análisis de estas regiones de más de 10 veces comparado con las técnicas citogenéticas convencionales. Entre las limitantes de esta técnica destacan la necesidad de contar con una sonda prediseñada para la región de interés, así como una alta sospecha sobre algún rearrreglo cromosómico en particular, y procedimientos relativamente laboriosos; por ejemplo, la prueba de FISH para las regiones teloméricas requiere entre 8 y 23 reacciones de hibridación dependiendo del formato utilizado.[67, 68]

Otro método utilizado para la búsqueda de desbalances genómicos a lo largo de todo el genoma de un individuo es la Hibridación Genómica Comparativa (CGH, por sus siglas en inglés). En esta prueba, dos genomas (el del individuo de interés y el de un individuo sano) son comparados directamente en búsqueda de diferencias en su contenido de DNA. Ambos genomas son fragmentados y marcados diferencialmente, cada uno con un fluorocromo distinto, para después hibridarse de manera simultánea sobre cromosomas normales en metafase. Posteriormente, se compara la proporción de los dos fluorocromos en cada una de las bandas cromosómicas. En caso de una delección o duplicación se identificará una menor o mayor proporción del fluorocromo con que fue marcado el genoma del sujeto de estudio, respectivamente. Aunque con esta técnica se han reportado desbalances de 3 a 3.5 Mb, en general tiene un resolución imitada, que está definida por el nivel de compactación de los cromosomas en metafase, habitualmente de 450 bandas por set haploide, con oportunidad de identificar desbalances tan pequeños como 5 a 10 Mb.[69, 70]

Para mejorar el nivel de resolución de la búsqueda de desbalances de material en todo el genoma, recientemente se ha desarrollado el estudio de Hibridación Genómica Comparativa en microarreglos (aCGH). Esta prueba está basada en los

mismos principios que la CGH convencional, excepto que utiliza como blanco para la hibridación millones de segmentos de DNA clonados y fijados a una pequeña placa de vidrio (representativos de todo el genoma) en lugar de cromosomas en metafase. Para su análisis se comparan las proporciones de fluorocromos mediante imágenes computarizadas y análisis con paquetes informáticos especialmente diseñados. Se han diseñado varios tipos de microarreglos, existen varios para el análisis de cromosomas completos, fragmentos de cromosomas, regiones específicas y para el genoma entero. La aCGH ofrece varias ventajas sobre el análisis citogenético convencional y sobre el FISH. Esta técnica es más fácil y rápida de realizar, debido a que su procesamiento es semiautomatizado; además, cuenta con una alta sensibilidad y resolución. Esta última está determinada tanto por la distancia entre los marcadores como por la longitud de las sondas usadas.[68, 71]

En una búsqueda en PubMed realizada por el autor en agosto de 2011, sobre el uso de estas técnicas para el estudio de la GQ, solo se identificó una publicación que reportó el análisis de líquido amniótico en búsqueda de alteraciones citogenéticas usando cariotipo y CGH convencional en 7 fetos con diagnóstico prenatal de GQ. Todos tuvieron cariotipo normal y sólo uno de ellos mostró una trisomía parcial del brazo largo del cromosoma 3 (ish cgh enh 3q26→qter); sin embargo, la revisión postnatal de dicho caso demostró que se trataba de un onfalocele roto y no de una GQ. Los autores sugirieron el uso de técnicas moleculares para el estudio de los defectos de pared abdominal.

Hasta el momento no tenemos conocimiento de estudios de aCGH realizados en pacientes con GQ.

## **2. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO**

### **2.1. Objetivos**

#### *Principal*

- Identificar posibles alteraciones cromosómicas submicroscópicas en pacientes con GQ mediante la técnica de microarreglos de DNA.

#### *Secundarios*

- Caracterizar distintos tipos de anomalías cromosómicas submicroscópicas, no identificadas mediante cariotipo convencional en pacientes con GQ.
- Identificar posibles relaciones fenotipo-genotipo en pacientes con GQ.
- Identificar regiones cromosómicas posiblemente relacionadas con la etiología de la GQ.
- Proponer algún gen como posiblemente implicado en la susceptibilidad o en la etiopatogenia de la GQ.

### **2.2. Hipótesis.**

Entre los pacientes con GQ, existen casos con alguna alteración cromosómica submicroscópica.

### **2.3. Diseño del estudio.**

Observacional, transversal, descriptivo

## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1. Universo.**

Pacientes con GQ

### **3.2. Unidades de observación.**

Pérdida o ganancia de material genético

### **3.3. Método de muestreo.**

No probabilístico, por conveniencia.

### **3.4. Tamaño de la muestra.**

Tres pacientes

### **3.5. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.**

*De inclusión:*

- a) Paciente con GQ nacido en el INPerIER.
- b) Con evaluación prenatal en el INPerIER, incluyendo la realización de al menos un ultrasonido de segundo nivel durante el segundo trimestre del embarazo, así como la evaluación prenatal por algún médico genetista.
- c) Sin historia de exposición a agentes teratógenos.
- d) Con evaluación clínica al nacimiento por Cirujano Pediatra y Médico Genetista en el INPerIER.
- e) Autorización por los padres o tutores mediante carta de consentimiento informado.



#### De exclusión

- a) Evaluación prenatal o al nacimiento que evidencie la presencia de bandas amnióticas.
- b) Presencia de onfalocele demostrada por la evaluación al nacimiento
- c) Consanguinidad entre los padres

#### De eliminación

- a) Retiro del consentimiento por los padres o tutores

### **3.6. Variables en estudio.**

#### *Variable independiente:*

- Nombre: Presencia de alteración citogenética submicroscópica
  - Definición: Reconocimiento de la pérdida o ganancia de un fragmento de DNA genómico de por lo menos 100kb de extensión en cualquier región del genoma, identificada mediante la técnica de microarreglos de DNA.
  - Tipo de variable: Dicotómica
  - Escala de medición: Presente / Ausente

#### *Variables dependientes:*

- Nombre: Presencia de gastrosquisis
  - Definición: Defecto de la pared abdominal localizado a la derecha de la inserción del cordón umbilical, por el cual protruyen parcial o

totalmente una o varias vísceras abdominales, sin membrana que las recubra.

- Tipo de variable: Dicotómica
- Escala de medición: Presente / Ausente
- Nombre: Presencia de alteraciones estructurales agregadas
  - Definición: Presencia de algún defecto estructural en el cuerpo del individuo con GQ, cuyo origen no se encuentre directamente relacionado con la presencia del defecto de la pared abdominal.
  - Tipo de variable: Nominal
  - Escala de medición: Nombre del defecto identificado.

### **3.7. Obtención de datos.**

Entre los recién nacidos atendidos en el INPerIER en los últimos 5 años, se identificaron aquellos que presentaron el diagnóstico de GQ. De manera retrospectiva, se revisaron sus expedientes para identificar a los primeros tres que cumplieran con los criterios de inclusión. Después, se investigó, vía telefónica, el estado actual del paciente y se invitó a su participación en el estudio. Los primeros tres pacientes en aceptar su participación en el estudio fueron programados para una cita de valoración y toma de muestra en el departamento de Genética del INPerIER, en donde se explicó detalladamente el estudio y se solicitó la firma del consentimiento informado. Posteriormente, se realizó un interrogatorio dirigido para evaluar anomalías del desarrollo, así como una exploración física en búsqueda de defectos externos mayores y menores.

Se extrajeron de cada paciente 3ml de sangre periférica mediante venopunción en extremidad superior. De la muestra obtenida, 1.5 ml se conservaron en un tubo con heparina al 1% y el material restante se conservó en un tubo con EDTA. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su procesamiento, el cual se realizó dentro de las primeras 48 hs a partir de su toma, en el Laboratorio de Citogenética del INPerIER y en el Laboratorio de Biología Molecular en el Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”.

La muestra conservada en heparina se procesó mediante técnica convencional para la obtención de cariotipo con bandas GTG. Se analizaron 30 metafases con una resolución de 400 a 450 bandas por set haploide, en búsqueda de alteraciones numéricas y/o estructurales detectables mediante esta técnica.

La muestra conservada en EDTA se procesó mediante técnica convencional para la extracción de DNA genómico. El DNA fue obtenido y procesado en el Laboratorio de Genética de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana” para su análisis con microarreglos de DNA GeneChip®Cyto Array (Cytogenetics Whole-Genome 2.7M Array). En la tabla B se resumen las características de este microarreglo.

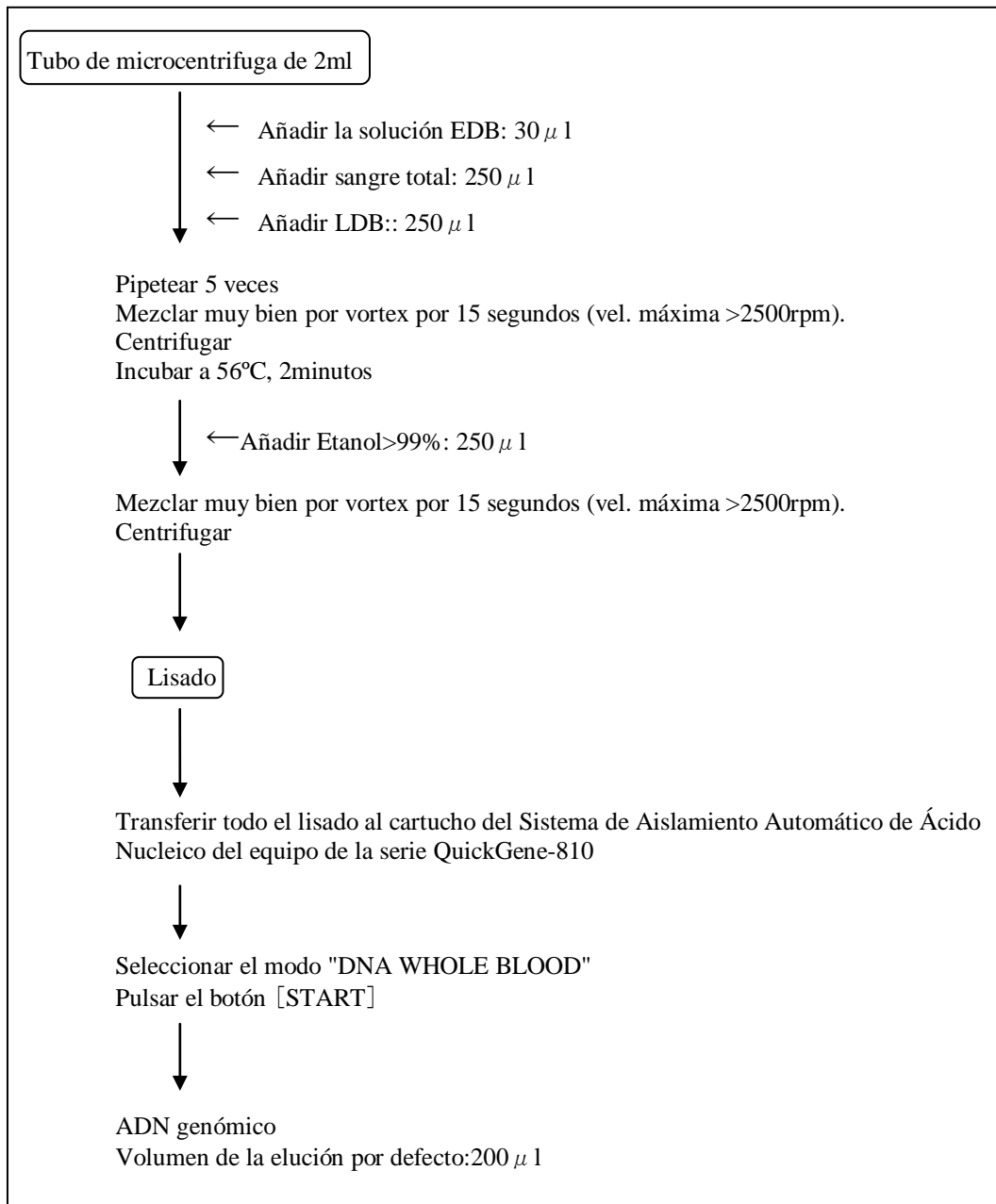
### **3.7.1. Extracción de DNA**

Para la extracción de ADN en Sangre Total Se usó el Sistema Automático de Aislamiento de Ácido Nucleico QuickGene junto con el kit S de QuickGene, siguiendo las recomendaciones del fabricante, las cuales se resumen en el Cuadro 1.

**Tabla B. Características del microarreglo Cytogenetics Whole-Genome 2.7 Array**

Número total de marcadores para número de copias	2,761,979
Número de marcadores no polimórficos	2,361,876
Número de marcadores SNP	400,103
Construceto del genoma	hg18
Marcadores autosómicos	2,622,342
Marcadores pseudoautosómicos	2,722
Marcadores intragénicos	1,434,797
Marcadores intergénicos	1,327,182
Separación media de los marcadores (pares de bases)	
Intragénicos	686
Genes en RefSeq	686
Genes para Cáncer	294
Genes del cromosoma X	666
Genes de relevancia citogenética / haploinsuficiencia	539
Genes en OMIM	637
Intergénica	833
General	735
Separación promedio de los marcadores (pares de bases)	1,086
Covertura	
Genes en RefSeq (18,701)	18,533 (99.1%)
Genes para Cáncer (318)	318 (100%)
Genes de relevancia citogenética / haploinsuficiencia (559)	548 (98.0%)
Genes del cromosoma X (801)	786 (98.1%)
Genes en OMIM (12,341)	12,242 (99.2%)

### Cuadro1. Metodología para la extracción de ADN



### 3.7.3. Metodología de la prueba de microarreglos

#### A. Preparación del DNA Genómico (DNAg).

- Determinar la concentración de cada muestra y corroborar que la relación  $OD_{260}/OD_{280}$  se encuentre entre 1.8 y 2.0.
- Diluir cada muestra de DNAg a una concentración de 33ng/ $\mu$ L en buffer TE 1X.
- Sellar, agitar en vortex y centrifugar brevemente (spin).
- Transferir 3  $\mu$ L de cada muestra de DNAg diluido, así como del DNA de referencia (incluido en el kit del proveedor) a tubos eppendorf de 0.2ml.
- Sellar y centrifugar brevemente.
- Dejar a temperatura ambiente si se procesarán de inmediato o guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$  si se procesarán en otro momento.

#### B. Amplificación del Genoma Completo

- Precalentar el termociclador por al menos 10 minutos.
- Descongelar a temperatura ambiente las muestras de DNA (en caso necesario) y los siguientes reactivos:
  - Buffer Cyto Amplif Rxn
  - Solución de Desnaturalización Cyto 10X (DS)
  - Solución de Neutralización Cyto 10X (NS)
- Agitar el Buffer Cyto Amplif Rxn vigorosamente en vortex a velocidad máxima durante 10 segundos y colocarlo inmediatamente en hielo.
- Agitar en vortex las soluciones DS y NS y dejarlas a temperatura ambiente.
- Diluir la solución DS. Para ello, colocar 2 $\mu$ L de la solución DS en 18  $\mu$ L de Cyto Water (incluido en el kit del proveedor). Agitar en vortex y centrifugar brevemente (spin). Dejar a temperatura ambiente.
- Diluir la solución NS. Para ello, colocar 4 $\mu$ L de la solución NS en 36  $\mu$ L de Cyto Water. Agitar en vortex, centrifugar brevemente (spin). Colocar en hielo.
- Añadir 3  $\mu$ L de la solución DS a las muestras, depositándola contra la pared de cada tubo. Sellar, agitar en vortex y centrifugar brevemente.
- Incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos.
- Añadir 6  $\mu$ L de NS a cada muestra, depositándola contra la pared del tubo. Sellar, agitar en vortex, centrifugar brevemente y colocar en hielo en un bloque de aluminio.
- Preparar la Mezcla Maestra de Amplificación (MMA). Para ello:

- Sacar del congelador el tubo con la mezcla enzimática de amplificación (Cyto Amplif Enzyme Mix) y colocarlo en una hielera.
- Mezclar su contenido con golpecitos rápidos y centrifugar brevemente (spin).
- Colocar 12  $\mu\text{L}$  de Cyto Amplif Enzyme Mix en 240 $\mu\text{L}$  de Buffer Cyto Amplif Rxn. Regresar inmediatamente la mezcla enzimática a la hielera.
- Agitar en vortex al 50% de la velocidad máxima, luego dar un golpecito rápido e invertir el tubo 2 veces. Repetir este paso una vez más.
- Centrifugar brevemente (spin) y poner en hielo.
- La Mezcla Maestra es muy viscosa. Centrifugar brevemente para eliminar cualquier burbuja.
- Depositar lentamente 52.5  $\mu\text{L}$  de la MMA a cada muestra procurando no formar burbujas.
- Sellar, agitar en vortex y centrifugar brevemente (spin)
- Colocar las muestras en un termociclador y efectuar el siguiente programa:
  - 30°C durante 16 horas
  - 65°C durante 3 minutos
  - 4°C mantener
- Procesar de inmediato las muestras o guardar a -20°C si se procesarán en otro momento.

### C. Purificación y Cuantificación

- Preparar el buffer de purificación (Cyto Purif Wash Buffer). Para ello, poner 10.5 mL de etanol 99.9% al bote del Cyto Purif Wash Buffer y agitar en vortex. Marcar el bote en la etiqueta para indicar que el buffer ya está preparado. Verter en otro reservorio 480  $\mu\text{L}$  de este buffer por cada muestra.
- Preparar las perlas magnéticas. Para ello, invertir el bote de Cyto Magnetic Beads 10 o más veces hasta que la solución se observe homogénea sin grumos de perlas.
- Preparar el Buffer de elución. Para ello, disponer de un alícuota del Cyto Elution Buffer de 50  $\mu\text{L}$  por cada muestra más 25% extra.
- Sacar las muestras del termociclador (en su caso, del refrigerador y dejar descongelar a temperatura ambiente), transferirlas a tubos de 0.6 mL
- Añadir 90  $\mu\text{L}$  de perlas a cada muestra
- Mezclar lentamente con la pipeta 10 veces, verificando que se aspiren y se depositen 90  $\mu\text{L}$  de la mezcla y teniendo cuidado de no generar burbujas.

- Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos
- Colocar los tubos en una barra para separación magnética durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las perlas formarán un botón en la pared del tubo más cercana al magneto.
- Retirar cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta ajustada a 160  $\mu\text{L}$  y desecharlo.
- Sin retirar los tubos de la barra de separación magnética, lavar las perlas dos veces de la siguiente manera:
  - Con una pipeta P200, añadir 200  $\mu\text{L}$  del buffer de purificación preparado y dispuesto en reservorio aparte.
  - Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
  - Retirar y desechar el sobrenadante.
  - Proceder inmediatamente al siguiente paso para evitar que las perlas se sequen.
- Sin retirar los tubos de la barra de separación magnética, añadir cuidadosamente 50  $\mu\text{L}$  del buffer de elución a cada muestra, por la pared del tubo justo por encima del botón de perlas, sin tocar este último.
- Cerrar los tubos y retirarlos de la barra de separación magnética. Colocarlos en una gradilla de unicel y fijar ésta con cinta adhesiva a la placa del vortex.
- Agitar en vortex durante 15 minutos a máxima velocidad.
- Verificar que las perlas se hayan resuspendido por completo. De lo contrario, agitar en vortex otros 10 minutos.
- Centrifugar durante 1 minuto a 1500 rpm.
- Colocar nuevamente los tubos en la barra de separación magnética durante 30 minutos
- Aspirar lentamente y transferir 45  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a un tubo nuevo.
- Sellar, agitar vigorosamente en vortex y centrifugar brevemente (spin).
- Medir el OD de cada muestra en un espectrofotómetro de la siguiente manera
  - En tubos de 0.6 ml, colocar 2  $\mu\text{L}$  de cada muestra y 198  $\mu\text{L}$  de agua de grado biológico (dilución 1:100)
- Sellar el tubo con la muestra restante y colocar en hielo.
- Sellar e invertir 3 veces los tubos con la dilución; luego centrifugarlos brevemente (spin).
- Medir el OD de cada muestra en un espectrofotómetro a 260 y 280.
- Calcular la concentración de la muestra usando la siguiente fórmula
 
$$\text{OD} \times 0.05 \mu\text{g}/\mu\text{L} \times 100 = \text{concentración de la muestra no diluída}$$
- La concentración del DNA debe ser mayor a 0.55  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . La relación OD260/OD280 debe ser entre 1.8 y 2.0.



- Procesar de inmediato las muestras o guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$  si se procesarán en otro momento.

#### D. Fragmentación y Marcaje

- Precalear el termociclador por al menos 10 minutos antes de usarlo
- Descongelar el buffer Cyto Frag and Label a temperatura ambiente.
- Agitar en vortex, centrifugar brevemente (spin) y colocar sobre hielo.
- Poner las muestras purificadas en hielo.
- Colocar un tubo Eppendorf de 0.6 mL en hielo (para el Master Mix).
- Transferir 37  $\mu\text{L}$  de cada muestra a tubos de 0.2  $\mu\text{L}$  y colocarlos en hielo.
- Transferir 48  $\mu\text{L}$  del buffer Cyto Frag and Label al tubo Eppendorf de 0.6 mL y dejarlo en hielo.
- Sacar el Cyto Frag and Label Enz Mix del congelador y colocarlo en hielo, darle un par de golpecitos para mezclarlo y después centrifugar brevemente (spin).
- Añadir 14.4  $\mu\text{L}$  del Cyto Frag and Label Enz Mix al tubo Eppendorf de 0.6 mL
- Regresar la mezcla enzimática inmediatamente al hielo.
- Sellar el tubo del Master Mix, agitarlo en vortex, centrifugarlo brevemente (spin) y colocarlo en hielo.
- Inmediatamente adicionar 13  $\mu\text{L}$  del Master Mix a cada muestra (volumen total de 50  $\mu\text{L}$  por tubo).
- Sellar, agitar en vortex y centrifugar brevemente (spin).
- Colocar las muestras en un termociclador y correr el siguiente programa:
 

$37^{\circ}\text{C}$	durante 2 horas
$95^{\circ}\text{C}$	durante 10 minutos
$4^{\circ}\text{C}$	mantener
- Preparar un gel de agarosa al 4% en TBE.
- Al terminar el programa, remover las muestras del termociclador, centrifugar brevemente y colocar en hielo.
- Tomar 2.5  $\mu\text{L}$  de cada muestra, colocarlos sobre un cuadro de parafilm a una distancia mayor a 1cm entre cada muestra.
- Añadir 2.5  $\mu\text{L}$  de buffer de carga a cada muestra y mezclar pipeteando.
- Cargar en el gel 5  $\mu\text{L}$  de un marcador de PCR y las muestras preparadas en parafilm.
- Correr el gel a 5 V/cm durante 40 minutos.
- Inspeccionar el gel. Verificar que en cada carril correspondiente a una muestra se debe observar una banda cuya intensidad comienza a disminuir alrededor de los 200 pb.

- Procesar de inmediato las muestras o guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$  si se procesarán en otro momento (si se desea, añadir Cyto Hyb Buffer a cada muestra antes de guardarlas).

#### E. Hibridación

- Precalentar el termociclador por lo menos durante 10 minutos.
- Precalentar el horno de hibridación durante 15 minutos a  $50^{\circ}\text{C}$  y 60 rpm.
- Colocar el Cyto Hyb Buffer sobre hielo durante 15 minutos antes de usarlo.
- Si las muestras están congeladas, descongelarlas a temperatura ambiente.
- Agitar las muestras en vortex y centrifugar brevemente (spin).
- Colocar las muestras sobre hielo.
- Sacar del refrigerador cada arreglo a utilizar, desempacarlo y marcarlo con la designación de la muestra correspondiente.
- Crear los archivos de registro en el programa AGCC e ingresar la información correspondiente a cada muestra.
- Escanear los códigos de barras en la columna Registration Batch, luego cargar el archivo al AGCC.
- Colocar cada arreglo con los septos hacia arriba.
- Insertar una punta de pipeta de 200  $\mu\text{L}$  en el septo superior derecho de cada arreglo.
- Colocar dos etiquetas autoadheribles en el borde de cada arreglo
- Dejar los arreglos aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente antes de usarlo.
- Invertir lentamente el Cyto Hyb Buffer en 5 ocasiones para mezclarlo, evitando crear burbujas.
- Añadir 100  $\mu\text{L}$  de Cyto Hyb Buffer a cada muestra (volumen total aproximado: 147.5  $\mu\text{L}$ ), aspirando y depositándolo lentamente.
- Sellar, agitar en vortex y centrifugar brevemente (spin).
- Colocar las muestras en un termociclador y correr el siguiente programa:
  - 95 $^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos
  - 50 $^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos
  - 50 $^{\circ}\text{C}$  mantener
- Abrir la tapa del termociclador dejando las muestras en el bloque a  $50^{\circ}\text{C}$ .
- Aspirar 130  $\mu\text{L}$  de la primera muestra e inyectarla lentamente en un arreglo 2.7M (septo inferior izquierdo)
- Retirar la punta de pipeta del septo superior derecho.

- Cubrir ambos septos con las etiquetas previamente adheridas al borde del arreglo, presionando firmemente para sellar completamente y prevenir evaporación y derrames.
- Cargar los arreglos en una bandeja del horno.
- Colocar inmediatamente la bandeja en el horno de hibridación. Todas las muestras deben estar dentro del horno en no más de 30 minutos.
- Dejar rotando los arreglos en el horno durante 16 a 19 horas a 50°C y 60 rpm.

#### F. Lavado, Tinción y Escaneo

- Encender la estación de fluidos
- Colocar los botes de 500mL llenos en las posiciones de Lavado A y B.
- Llenar el bote de dH<sub>2</sub>O.
- Vaciar el bote de desechos.
- Abrir el programa *Affymetrix Launcher* en la computadora
- En la ventana del *Launcher*, dar doble click al botón *AGCC Fluidics Control*.
- Configurar el programa
  - Abrir el menú de la opción *Protocol* y seleccionar *PRIME\_450*.
  - Marcar la caja *Check/Uncheck All Stations and Modules*.
  - Desmarcar las cajas correspondientes a los módulos que no se usarán
  - Presionar al botón *Copy to Selected Modules*.
- Presionar el botón *Run All*.
- Seguir la indicaciones desglosadas en la columna *Current Stage and Time/Cycle* de la ventana de control.
- Sacar el *Cyto Stain Buffer 1*, *Cyto Stain Buffer 2* y el *Cyto Holding Buffer* del refrigerador.
- Mezclar invirtiendo cada bote 5 veces y dejar a temperatura ambiente.
- Alicuotar los buffers a tubos de 1.5 mL (1 tubo por arreglo) como se indica a continuación:
 

<i>Cyto Stain Buffer 1</i>	tubo color ámbar	500 µL
<i>Cyto Stain Buffer 2</i>	tubo color azul	500 µL
<i>Cyto Holding Buffer</i>	tubo color natural	800 µL
- Regresar los buffers no utilizados a 4°C.
- Colocar los buffers en la estación de fluidos de la siguiente manera
  - Posición 1: *Cyto Stain Buffer 1* (tubo ámbar)
  - Posición 2: *Cyto Stain Buffer 2* (tubo azul)
  - Posición 3: *Cyto Holding Buffer* (tubo natural)
- Seleccionar el protocolo *Cytogenetics\_Array\_450* y presionar *Run*.

- Cuando se anuncie *Eject Washblock*, bajar las palancas de los cartuchos.
- Retirar los arreglos del horno de hibridación (máximo 4 arreglos a la vez). Si se procesan más de 4 arreglos:
  - Remover 4 arreglos después de 16 hr
  - Remover 4 arreglos después de 17 hr 30 min
  - Remover 4 arreglos después de 19 hr
- Retirar las etiquetas de cada arreglo.
- Remover el *Hyb Buffer* de cada arreglo (para recuperar la muestra no hibridada) y sustituirlo con *Hold Buffer*.
- Cuando se anuncie *Load Cartridge*, escanear el código de barras del arreglo, colocarlo en la estación de fluidos y asegurarlo con el seguro de lavado.
- Cuando se anuncie cargar los reactivos (*Load Stain 1 in vial 1...*), bajar la palanca correspondiente para ajustar los tubos en su lugar e iniciar el protocolo.
- Encender el scanner y dejarlo calentar por 10 min.
- En la ventana del *Launch*, oprimir el botón *AGCC Scan Control*.
- Cuando se anuncie *Eject Cartridge*, remover un arreglo a la vez, verificar que no se hayan formado burbujas y colocarlo en la mesa de trabajo. Si se formaron burbujas volver a colocarlo en la estación de fluidos para un nuevo ciclo de lavado y tinción.
- Reajustar los seguros *Washblocks* y dejar que finalice el protocolo.
- Remover y desechar los viales de los reactivos.
- Colocar etiquetas en los septos de cada arreglo cuidando que no invadan el círculo central del arreglo.
- Revisar que las ventanas de los arreglos o tengan polvo. En caso necesario, limpiar con papel para lentes.
- Colocar inmediatamente los arreglos en el dispensador automático, empezando por la posición 1.
- Repetir el proceso hasta haber cargado todos los arreglos en el carrusel del dispensador automático.
- En el programa *GeneChip Scanner* oprimir el icono *Start*
- Marcar la caja "Arrays in carousel positions 1-4 a temperature ambiente". Si los arreglos no estuvieran a temperatura ambiente, no marcar esta caja (el scanner esperará 10 min antes de iniciar el escaneo).
- Esperar a que termine el escaneo.

### 3.8. Análisis de los microarreglos.

Para el análisis citogenético de los microarreglos, se utilizó el programa Chromosome Analysis Suite (ChAS). Primero, se verificó que los valores QC (Quality Control) de cada prueba se encontraran dentro de los límites recomendados internacionalmente y establecidos por el proveedor en el programa. Éstos fueron un valor de **snpQC** (para sondas de SNPs)  $\geq 1.1$ , y un valor de **mapd** (para sondas de CNVs)  $\geq 0.8$ . Todas las sondas mostraron un adecuado valor QC en las tres pruebas realizadas.

Posteriormente, se identificaron los segmentos que mostraron alguna ganancia o pérdida de material genómico. Basados en la literatura internacional, los segmentos considerados fueron aquellos en los cuales la longitud del segmento involucrado fuera igual o mayor a 25 kb e incluyera al menos 20 marcadores consecutivos.

## 4. RESULTADOS.

### 4.1. Descripción de la muestra de estudio.

Las características generales (tabla 1) y clínicas (tabla 2) de los casos fueron muy similares. En cada uno de ellos fue posible descartar la presencia de otros defectos congénitos estructurales, así como alteraciones en su desarrollo psicomotor hasta el momento de su ingreso al estudio, por lo cual se concluyó que en cada caso presentó una GQ aislada. La severidad del defecto también fue muy similar entre los casos y ninguno de ellos mostró dismorfias faciales menores. No se identificó algún factor de riesgo para la presencia de enfermedad genética.

**Tabla 1. Características Generales de los Pacientes Estudiados**

Caso	Sexo	OG	Cons	EM	EGDx	EGN	VN	Somatometría al nacimiento			Apgar (1'-5')	SA
								Peso	Talla	PC		
1	Mas	1	No	17	16	36	Ces	3218	48	35	8-9	2
2	Fem	1	No	16	16	36	Ces	1945	42	31	8-9	2
3	Mas	1	No	26	17	40	Ces	3025	51	33	4-9	2

OG= Orden de gestación. Cons= Consanguinidad entre los padres. EM= Edad materna en años al momento de la concepción. EGDx= Edad gestacional en semanas al momento del diagnóstico. EGN= Edad gestacional en semanas al nacimiento. VN= Vía de nacimiento. Ces= Cesárea. SA= Calificación de Silverman Andersen.

**Tabla 2. Características Clínicas de los Pacientes Estudiados**

Caso	Edad*	Características de la GQ			ODE	DPM
		Tamaño (cm)	Material Protruyente	DGIA		
1	2a/9m	3.5x2	Intestino delgado y colon.	Ninguno	No	Normal
2	9m	3x2	Estómago, intestino delgado, colon, tuba uterina y ovario izquierdos.	Ninguno	No	Normal
3	2a/11m	2x2	Estómago, intestino delgado y colon.	Ninguno	no	Normal

\*Edad al momento de su inclusión en el estudio. GQ= Gastrosquisis. MP= Material Protruyente. DGIA= Defectos gastrointestinales asociados. ODE= Otros defectos estructurales. DPM= Desarrollo psicomotor.

## 4.2. Estudio de Microarreglos.

Con el estudio de microarreglos se identificaron en total 27 segmentos con alteración en el número de copias de material genómico (Tablas 3 a 5), 18 de ellas fueron ganancias y 9 pérdidas. En el caso 1 predominaron las pérdidas (6/8), mientras que en los casos 2 y 3 predominaron las ganancias (8/10 y 8/9, respectivamente).

El tamaño de los segmentos identificados varió entre 28kb y 2400kb. De los 27 segmentos, 17 fueron de un tamaño menor a 100kb, 3 de 100kb a 200kb y solo 7 tuvieron un tamaño mayor a 200kb. De estos últimos, cuatro fueron ganancias (122kb en Yq11.22, 338kb en Yq11.22, 365kb en 1q21.1, 393kb en Yq11.2, y 2400kb en 9p13.1, todas ellas en el caso 3) y 3 pérdidas (234kb en 15q14 y 347kb en 14q11.2 en el caso 1, además de 333kb en 14q11.2 en el caso 2).

Entre los segmentos mayores a 200kb, las ganancias identificadas en 1q21.1, en 9p13.1 y en el cromosoma Y, así como la pérdida en 15q14, correspondieron a CNVs previamente descritos sin asociación con enfermedad (Database of Genomic Variants. <http://projects.tcag.ca/variation/>).

La mayoría de los desbalances identificados se encontraron en una sola ocasión. No se identificó alguna ganancia que estuviera presente en más de un caso. Por el contrario, entre las pérdidas, se identificó una muy similar en dos de los tres casos, uno de sexo femenino y otro de sexo masculino. Estas pérdidas se encontraron en el locus 14q11.2 y tuvieron un tamaño muy similar; 347kb en el paciente 1 y 333kb en el paciente 2. La delección en el paciente 1 involucró el segmento comprendido entre el nucleótido 21,560,935 y el nucleótido 21,908,471 (UCSC hg19, Febrero 2009).

**Tabla 3. Segmentos de interés identificados en el paciente 1.**

Tipo	Locus	Número de Copias	Longitud (kb)	Inicio (nt)	Final (nt)	No. De marcadores	Confianza
<b>Ganancias</b>							
	6q12	3	45	66,260,422	66,305,502	57	0.8977
	Yp11.2	1	29	6,990,022	7,019,178	35	0.9130
<b>Pérdidas</b>							
	2q32.3	1	69	194,626,163	194,696,112	41	0.9231
	11q14	1	98	84,539,960	84,638,509	83	0.9343
	14q11.2	1	347	21,560,935	21,908,471	143	0.8488
	15q14	1	239	32,431,935	32,671,608	38	0.8585
	15q25.2	1	34	79,830,433	79,864,636	25	0.9213
	Xp11.1	1	76	58,108,339	58,184,681	45	0.8688

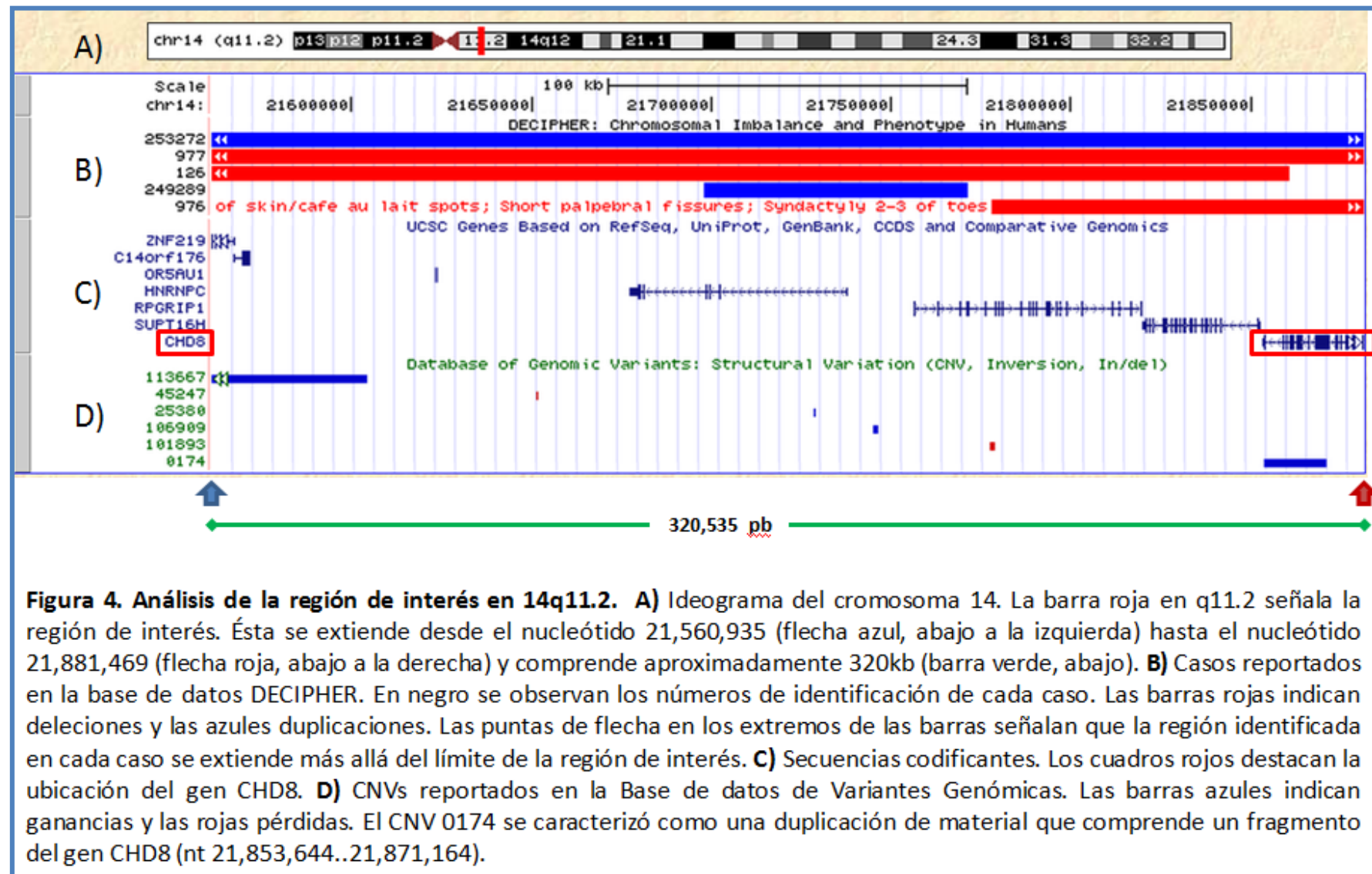
**Tabla 4. Segmentos de interés identificados en el paciente 2.**

Tipo	Locus	Número de Copias	Longitud (kb)	Inicio (nt)	Final (nt)	No. De marcadores	Confianza
<b>Ganancias</b>							
	4p14	3	72	39,99,170	39,571,543	67	0.9293
	8q24.3	3	116	141,663,287	141,779,367	100	0.8742
	11q23.1	3	28	112,332,182	112,360,406	27	0.8948
	14q32.2	3	49	96,361,220	96,411,100	36	0.8921
	19q12	3	75	35,147,137	35,222,775	43	0.8904
	Xp11.4	2	92	39,796,306	39,889,113	53	0.8434
	Xq21.33	2	39	94,235,061	94,274,752	29	0.9151
	Xq22.3	2	63	107,286,652	107,350,059	72	0.8382
<b>Pérdidas</b>							
	7p14.1	1	108	38,260,449	38,369,129	21	0.8855
	14q11.2	1	333	21,548,265	21,881,469	154	0.8542

**Tabla 5. Segmentos de interés identificados en el paciente 3.**

Tipo	Locus	Número de Copias	Longitud (kb)	Inicio (nt)	Final (nt)	No. De marcadores	Confianza
<b>Ganancias</b>							
	1q21.1	3	365	147,137,029	147,502,714	38	0.8931
	2p25.3	3	82	559,066	641,407	21	0.9240
	9p13.1	3	2400	39,407,981	41,808,638	156	0.8955
	Yp11.2	1	71	6,794,267	6,865,857	36	0.8322
	Yq11.21	1	393	14,249,862	14,643,039	29	0.9333
	Yq11.21	1	48	13,366,441	13,415,197	54	0.8546
	Yq11.22	1	122	20,207,968	20,330,567	31	0.9095
	Yq11.22	1	338	21,092,173	21,430,960	76	0.8795
<b>Pérdidas</b>							
	15q26.1	1	86	91,952,462	92,038,582	87	0.9110





**Figura 4. Análisis de la región de interés en 14q11.2.** **A)** Ideograma del cromosoma 14. La barra roja en q11.2 señala la región de interés. Ésta se extiende desde el nucleótido 21,560,935 (flecha azul, abajo a la izquierda) hasta el nucleótido 21,881,469 (flecha roja, abajo a la derecha) y comprende aproximadamente 320kb (barra verde, abajo). **B)** Casos reportados en la base de datos DECIPHER. En negro se observan los números de identificación de cada caso. Las barras rojas indican deleciones y las azules duplicaciones. Las puntas de flecha en los extremos de las barras señalan que la región identificada en cada caso se extiende más allá del límite de la región de interés. **C)** Secuencias codificantes. Los cuadros rojos destacan la ubicación del gen CHD8. **D)** CNVs reportados en la Base de datos de Variantes Genómicas. Las barras azules indican ganancias y las rojas pérdidas. El CNV 0174 se caracterizó como una duplicación de material que comprende un fragmento del gen CHD8 (nt 21,853,644..21,871,164).

Para el paciente 2, el segmento deletado comprendió desde el nucleótido 21,548,265 hasta el nucleótido 21,881,469 (UCSC hg19, Febrero 2009). Las deleciones identificadas en estos pacientes se sobrelaparon en una región genómica común de aproximadamente 320kb entre los nucleótidos 21,560,935 y 21,881,469; por lo cual se propuso a éste segmento como “región de interés” para el análisis complementario (Fig. 4).

Utilizando las herramientas electrónicas de la Universidad de Santa Cruz, California (UCSC, <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?org=human>), se realizó una búsqueda de otros casos con una deleción similar a la “región de interés” en la base de datos DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Human using Ensembl Resources). Se encontraron tres pacientes no relacionados, con retraso mental, dismorfias menores, cariotipo normal y con una pérdida de novo de material genético que involucró toda o parte de la región de interés en 14q11.2, identificados como los casos 126, 976 y 977 de dicha base de datos. Dos de ellos (casos 126 y 977) presentaron pérdidas mucho mayores a la región de interés (1.08Mb y 1.62Mb, respectivamente), mientras que el caso 976 presentó la pérdida de un fragmento más pequeño (150kb). El caso 977 incluyó toda la región de interés identificada en nuestro estudio, el caso 126 incluyó casi toda la región de interés con excepción de las 20.4kb más distales, mientras que el caso 976 solo coincidió en las últimas 103.7kb más distales. Las deleciones reportadas en estos pacientes se sobrelaparon en una región genómica común de aproximadamente 35kb que incluyó los genes SUPT16H (605012) y CHD8 (610528). Las características clínicas de estos casos fueron reportadas por Zahir y cols. (2007). Los tres pacientes mostraron hipotonía en la infancia, retraso en el desarrollo y compromiso cognoscitivo, así como

una apariencia dismórfica similar caracterizada por ojos muy espaciados, puente nasal aplanado y ancho, nariz corta, filtrum largo, boca pequeña, arco de Cupido prominente, labio inferior ancho, cejas triangulares en su porción medial y escasas en la porción lateral, así como malformación de la raíz del hélix. Uno de los casos presentó una comunicación interventricular y persistencia del conducto arterioso. Estos mismos autores realizaron una revisión bibliográfica de los casos con delección 14q11.2 reportados previamente, encontrando 10 casos no relacionados con deleciones o translocaciones que involucraron la región cromosómica 14q11-q22 (chromosome 14q11-q22 deletion syndrome; MIM ID #613457); sin embargo, al realizar la comparación de los sitios de ruptura se encontró que la región deletada en los 3 pacientes que ellos reportaron no se sobrelapó con las deleciones 14q11-q22 reportadas previamente. En ninguno de los casos reportados con delección que involucró la región 14q11 se reportó la presencia de algún defecto de la pared abdominal.

Al realizar la búsqueda de una pérdida similar en la base de datos de un grupo de 600 individuos sanos de origen caucásico (Joris Veltman Ph.D., Genomic Disorders Nijmegen, Amsterdam Holanda; <http://www.genomicdisorders.nl/joris>), se identificó a un solo individuo con la pérdida de un segmento con sobrelapamiento mínimo con la región de interés en 14q11.2. Este segmento comprendió aproximadamente 10.5kb entre los nucleótidos 21,811,905 y 21,822,451.

Asimismo, se realizó la comparación del segmento de interés con las variantes en el número de copias (CNVs) en la Database of Genomic Variants (DGV, Centre for Applied Genomics). Se identificaron 6 CNVs dentro del segmento de interés, ninguna

de ellas con solapamiento. Cuatro de ellas fueron ganancias y solo dos fueron pérdidas. De estas últimas, una (variación 45247 del DGV) de 387pb (chr14:21,651,282-21,651,669) y la otra (variación 101893 del DGV) de 1.4kb (chr14:21,777,643-21,779,085).

## 5. DISCUSIÓN

Con base en los criterios de tamaño mayor a 200kb, presencia en más de un caso, y relación con CNVs descritos en bases públicas, los resultados obtenidos indican que el segmento de interés en 14q11.2 no se trata de un CNV común y que éste podría estar asociado con la presencia de GQ.

Por lo anterior, se realizó una búsqueda de genes codificantes incluidos en el segmento de interés en 14q11.2, identificado en dos de los pacientes con GQ analizados en este estudio. En la tabla 7 se enlistan los genes identificados y las funciones descritas para cada uno. Entre ellos, el gen *CHD8* es el único para el cual se ha descrito una participación importante en la morfogénesis temprana. Este gen codifica la proteína 8 de unión al DNA con cromodominio helicasa (Chromodomain Helicase DNA-binding protein 8) y es miembro de la familia de proteínas CHD, caracterizadas por su actividad de remodelación de cromatina. [72]

Las enzimas remodeladoras de cromatina pueden agruparse en dos grandes categorías: complejos que alteran la estructura de la cromatina a través de modificaciones covalentes de histonas y complejos dependientes de ATP que pueden alterar tanto la estructura como la posición del nucleosoma. [73, 74].

**Tabla 7. Secuencias codificantes identificadas en la región de interés (nt 21,560,935 - 21,881,469)**

Símbolo	Nombre	Nt inicial	Nt final	Funciones principales
ZNF219	Zinc finger protein 219	21,558,205	21,572,863	Reprime la transcripción de la proteína HMG1 (High Mobility Group nucleosomal binding protein 1) implicada en la estructuración de la cromatina de genes transcripcionalmente activos.
C14orf176	Chromosome 14 open Reading frame 176	21,569,511	21,571,883	Desconocida. Proteína transmembranal.
OR5AU1	Olfactory receptor, family 5, subfamily AU, member 1	21,623,096	21,624,184	Receptor olfatorio. Participa en la percepción del olor.
HNRNPC	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)	21,677,295	21,737,638	Proteína de unión a RNA. Actúa como tetrámero y participa en el ensamblaje de partículas hnRNP 40S (ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas de expresión ubicua) que participan en el transporte y splicing del RNAm
RPGRIP1*	Retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1	21,756,136	21,819,460	Codifica una proteína fotorreceptora en los conos y bastones retinianos. Las mutaciones en este gen condicionan ceguera congénita con patrón de herencia autosómico recesivo.
SUPT16H*	Supresor of Ty 16 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	21,819,631	21,852,425	Codifica la subunidad de 140kDa del factor FACT (facilitates chromatin transcription), el cual se une a las histonas H2A/H2B para facilitar la transcripción
CHD8	Chromodomain helicase DNA binding protein 8	21,853,353	21,905,457	Codifica una DNA helicasa remodeladora de cromatina que actúa como represora de la transcripción. Regula negativamente la vía de señalización de Wnt, implicada en la morfogénesis temprana de los vertebrados.

\*Incluido en la región deletada en el individuo control de la base de datos de población caucásica.

Las enzimas remodeladoras de cromatina dependientes de ATP modulan los contactos entre las histonas y el DNA. In vitro, estas enzimas catalizan cambios estructurales que permiten el acceso de diversos factores al DNA del nucleosoma, la reposición de nucleosomas sobre una cadena molde, la transferencia de octámeros de histonas a DNA desnudo, y reemplazo de histonas por variantes de histonas. In vivo, estas actividades son cruciales para la transcripción, replicación, reparación y recombinación del genoma eucariota. Estas enzimas remodeladoras pueden dividirse en numerosas familias basados en la arquitectura de sus dominios. Una de esas familias es la CHD (chromodomain, helicase, DNA binding). Estas enzimas se caracterizan por presentar dos cromodominios N-terminales en tándem seguidos de un dominio Snf2 con función catalítica ATPasa/helicasa, responsable del remodelamiento.[75]

El grupo de proteínas CHD puede dividirse en tres subgrupos de acuerdo a similitudes en su secuencia y la presencia de dominios funcionales adicionales. CHD8 pertenece, junto con CHD6, CHD7 y CHD9 al subgrupo III. Las características distintivas de este subgrupo son la presencia de tres regiones conservadas (CR1-CR3), un dominio SANT y dos dominios BRK. Hasta la fecha, las funciones moleculares de los miembros del subgrupo III son poco conocidas. La Duplina, una variante de CHD8 por splicing del extremo NH<sub>2</sub>, originalmente descubierta como una proteína de unión a  $\beta$ -catenina, contiene solo los dos primeros cromodominios. Estos dominios son regiones de 40-50 aminoácidos que pueden servir como módulos de interacción de proteínas, módulos de unión a RNA, o módulos de unión a DNA. Específicamente, se ha observado que los cromodominios de CHD8 interactúan específicamente con la histona H3 trimetilada en la lisina 4. [73, 75]

Se ha demostrado que CHD8 interactúa con la proteína humana Staf (ZNF143), un factor de transcripción con dedos de zinc, que controla la expresión del gen U6. Además, ha sido purificada entre los componentes del complejo MLL1-WDR5, y se ha demostrado su interacción directa con  $\beta$ la -catenina logrando reprimir los genes blanco de ésta. CHD8 también se une a la proteína de unión a aislante CTCF, y el complejo CHD8/CTCF juega un papel importante en la regulación epigenética de sitios de aislamiento. Asimismo, se ha demostrado que se asocia con la RNA polimerasa durante el proceso de elongación y controla la expresión de la ciclina E2 y de la timidilato sintetasa.[72-74] Además, CHD8 interactúa con SRF, afectando la expresión de genes dependientes de SRF característicos del proceso de diferenciación.

Utilizando células de músculo liso vascular con disminución en la expresión de CHD8 de aproximadamente 60 a 70%, Rodenberg y cols. (2010) observaron una disminución significativa en la expresión de algunos marcadores de diferenciación de músculo liso (smMHC y calponina) en un 40 a 50%; así como la presencia de apoptosis en ausencia de algún estímulo adicional. Cuando estas mismas células se expusieron a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para semejar el daño por radicales libres generado durante alguna lesión vascular, los niveles de apoptosis aumentaron de manera importante. Para identificar las posibles proteínas blanco sobre las que podría actuar CHD8, estos mismos autores realizaron un rastreo con microarreglos de 84 genes relacionados con apoptosis, mediante el cual identificaron un decremento en la expresión de un par de proteínas antiapoptóticas (CARD10 y Birc5/survivina); así como un aumento en la expresión de la proteína proapoptotica Caspasa 1, proponiendo que CHD8 interactúa con SRF y CTCF para regular la expresión de Birc5 y CARD10 y por lo tanto promueve la supervivencia de las células de músculo liso.[76]

Por otro lado, los ratones knockout CHD8/Duplina (simultáneamente carentes de CHD8 y de Duplina, la forma alternativa de CHD8 consistente en su cromodominio amino terminal) mueren en etapas embrionarias tempranas y no forman estría primitiva o placa mesodérmica durante la gastrulación, indicando que el complejo CHD8/Duplina juega un papel crítico en el desarrollo temprano. Estos ratones knockout también muestran una apoptosis elevada que puede ser rescatada parcialmente al cruzar dichos ratones knockout con ratones knockout para p53, sugiriendo que CHD8 juega un papel en la protección celular contra la apoptosis inducida por p53.[77]

Estudios complementarios en ratones han demostrado que el daño al genoma durante el desarrollo temprano, producido por agentes con potencial teratogénico (tales como la radiación ionizante y los benzopirenos), condiciona una hipersensibilidad celular que desencadena incremento en la apoptosis, y ésta a su vez, el desarrollo de diversos defectos estructurales embrionarios.[78-80] Dicha hipersensibilidad parece resultar de una disfunción telomérica condicionada por defectos en la vía de señalización de p53.[81] En 2005, Bekaert y cols. estudiaron ratones deficientes en p53 (p53+/- y p53-/-) y compararon su sensibilidad para el desarrollo de defectos estructurales inducidos con la exposición a 0.5 Gy de radiación X en los días 1, 8 u 11 postfertilización (correspondientes a los estadios de una célula, gastrulación y organogénesis tardía, respectivamente). Los defectos más frecuentemente encontrados en dicho estudio fueron: exencefalia, paladar hendido, polidactilia y GQ. Esta última solo se observó en los ratones radiados los días 8 u 11. Además, en los ratones con defectos se identificó una longitud telomérica significativamente menor, más evidente en los ratones p53-/-, así como una mayor



inestabilidad cromosómica, demostrada por la presencia de deleciones, rupturas cromosómicas, fusiones cromosómicas término-terminales y fusiones semejantes a Robertsonianas.[82]

Por otra parte, una proteína altamente relacionada a CHD8, CHD7, se encuentra mutada en casos con asociación CHARGE, la cual cursa con numerosos defectos congénitos, incluyendo anomalías abdominales como hernia umbilical y onfalocele.[75]

Tomando en cuenta todos estos elementos, consideramos que CHD8 constituye un gen candidato para gastrosquisis en humanos.

## **6. CONCLUSIONES.**

Mediante el análisis de microarreglos en pacientes con GQ fue posible identificar un CNV consistente en la pérdida de aproximadamente 320kb en el locus 14q11.2, el cual no se ha reportado en individuos sanos de otros estudios internacionales, por lo que se propone que podría estar asociado con la presencia de dicho defecto.

Entre los genes contenidos en la región mencionada, destaca el CHD8, por su participación tanto en mecanismos reguladores de la expresión génica, como en la regulación de la apoptosis mediada por p53, la cual se ha demostrado que participa de manera importante en el desarrollo temprano del tejido muscular y se ha asociado con la presencia de GQ en ratones knockout para p53 expuestos a radiación ionizante en periodo embrionario.

Posiblemente, la haploinsuficiencia del gen CHD8, las variantes alélicas de este gen, o la combinación de ambos, puedan ser factores genéticos de predisposición para el desarrollo de GQ en fetos expuestos a factores ambientales aún no determinados.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Aase, J.M., *Principles of Normal and Abnormal Embryogenesis*, in *Diagnostic Dysmorphology*, P.M.B. Company, Editor 1990: New York and London. p. 5-13.
2. Morales, J.J., Luna, L., Mutchinick, O.M., *Epidemiología de las Malformaciones Congénitas*, in *Genética Clínica: Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias*, S.a.d.C.V. El Manual Moderno, Editor 2001: México, D.F. p. 345-350.
3. Jones, K.L. and D.W. Smith, *Smith's recognizable patterns of human malformation*. 5th ed 1997, Philadelphia: Saunders. xviii, 857 p.
4. Stevenson, R.E., *Human malformations and related anomalies*. 2nd ed. Oxford monographs on medical genetics 2006, Oxford ; New York: Oxford University Press. xiv, 1495 p.
5. Kumar, P. and B.K. Burton, *Congenital malformations : evidence-based evaluation and management* 2008, New York: McGraw-Hill Medical. xv, 390 p.
6. Nyberg, D.A., B.S. Mahony, and D. Pretorius, *Diagnostic ultrasound of fetal anomalies : text and atlas* 1990, Chicago: Year Book Medical Publishers. xiii, 778 p.
7. Carlson, B.M., *Human embryology and developmental biology*. 4th ed 2009, Philadelphia, PA: Mosby/Elsevier. xvi, 541 p.
8. Moore, K.L. and T.V.N. Persaud, *The developing human : clinically oriented embryology*. 7th ed 2003, Philadelphia, Pa.: Saunders. xv, 560 p.
9. Hunter, A.G. and R.E. Stevenson, *Gastroschisis: clinical presentation and associations*. American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics, 2008. **148C**(3): p. 219-30.
10. Feldkamp, M.L., J.C. Carey, and T.W. Sadler, *Development of gastroschisis: review of hypotheses, a novel hypothesis, and implications for research*. American journal of medical genetics. Part A, 2007. **143**(7): p. 639-52.
11. Jones, K.L., K. Benirschke, and C.D. Chambers, *Gastroschisis: etiology and developmental pathogenesis*. Clinical genetics, 2009. **75**(4): p. 322-5.
12. Correia-Pinto, J., et al., *A new fetal rat model of gastroschisis: development and early characterization*. Journal of pediatric surgery, 2001. **36**(1): p. 213-6.
13. Mastroiacovo, P., et al., *Gastroschisis and associated defects: an international study*. American journal of medical genetics. Part A, 2007. **143**(7): p. 660-71.
14. Williams, L.J., et al., *Epidemiology of gastroschisis in metropolitan Atlanta, 1968 through 2000*. Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology, 2005. **73**(3): p. 177-83.
15. Laughon, M., et al., *Rising birth prevalence of gastroschisis*. Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association, 2003. **23**(4): p. 291-3.
16. Hougland, K.T., et al., *Increasing prevalence of gastroschisis in Utah*. Journal of pediatric surgery, 2005. **40**(3): p. 535-40.
17. Research, I.C.f.B.D.S.a., *Annual Report*, I.C.C.f.B. Defects, Editor 2007, International Clearinghouse Centre for Birth Defects: Atlanta.
18. Lindham, S., *Omphalocele and gastroschisis in Sweden 1965--1976*. Acta paediatrica Scandinavica, 1981. **70**(1): p. 55-60.
19. Hemminki, K., et al., *Gastroschisis and omphalocele in Finland in the 1970s: prevalence at birth and its correlates*. Journal of epidemiology and community health, 1982. **36**(4): p. 289-93.
20. Martinez-Frias, M.L., et al., *Epidemiological study of gastroschisis and omphalocele in Spain*. Teratology, 1984. **29**(3): p. 377-82.
21. Roeper, P.J., et al., *Secular rates and correlates for gastroschisis in California (1968-1977)*. Teratology, 1987. **35**(2): p. 203-10.
22. Nichols, C.R., J.E. Dickinson, and P.J. Pemberton, *Rising incidence of gastroschisis in teenage pregnancies*. The Journal of maternal-fetal medicine, 1997. **6**(4): p. 225-9.

23. Penman, D.G., et al., *Increase in incidence of gastroschisis in the south west of England in 1995*. British journal of obstetrics and gynaecology, 1998. **105**(3): p. 328-31.
24. Di Tanna, G.L., A. Rosano, and P. Mastroiacovo, *Prevalence of gastroschisis at birth: retrospective study*. BMJ, 2002. **325**(7377): p. 1389-90.
25. Baerg, J., et al., *Gastroschisis: A sixteen-year review*. Journal of pediatric surgery, 2003. **38**(5): p. 771-4.
26. Reid, K.P., J.E. Dickinson, and D.A. Doherty, *The epidemiologic incidence of congenital gastroschisis in Western Australia*. American journal of obstetrics and gynecology, 2003. **189**(3): p. 764-8.
27. Salihu, H.M., et al., *Omphalocele and gastroschisis in the State of New York, 1992-1999*. Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology, 2003. **67**(9): p. 630-6.
28. Kazaura, M.R., et al., *Increasing risk of gastroschisis in Norway: an age-period-cohort analysis*. American journal of epidemiology, 2004. **159**(4): p. 358-63.
29. Bermejo, E., et al., *The incidence of gastroschisis: is also increasing in Spain, particularly among babies of young mothers*. BMJ, 2006. **332**(7538): p. 424.
30. Mastroiacovo, P., A. Lisi, and E.E. Castilla, *The incidence of gastroschisis: research urgently needs resources*. BMJ, 2006. **332**(7538): p. 423-4.
31. Byron-Scott, R., et al., *A population-based study of abdominal wall defects in South Australia and Western Australia*. Paediatric and perinatal epidemiology, 1998. **12**(2): p. 136-51.
32. Kilby, M.D., *The incidence of gastroschisis*. BMJ, 2006. **332**(7536): p. 250-1.
33. Baird, P.A. and G.C. Fraser, *Information sought on incidence of gastroschisis*. Canadian Medical Association journal, 1972. **107**(6): p. 496.
34. Yang, P., et al., *Genetic-epidemiologic study of omphalocele and gastroschisis: evidence for heterogeneity*. American journal of medical genetics, 1992. **44**(5): p. 668-75.
35. Torfs, C.P., et al., *A population-based study of gastroschisis: demographic, pregnancy, and lifestyle risk factors*. Teratology, 1994. **50**(1): p. 44-53.
36. Hsu, C.C., et al., *Omphalocele and gastroschisis in Taiwan*. European journal of pediatrics, 2002. **161**(10): p. 552-5.
37. Kunz, L.H., W.M. Gilbert, and D.R. Towner, *Increased incidence of cardiac anomalies in pregnancies complicated by gastroschisis*. American journal of obstetrics and gynecology, 2005. **193**(3 Pt 2): p. 1248-52.
38. Kilic, N., et al., *Oromandibular limb hypogenesis and gastroschisis*. Journal of pediatric surgery, 2001. **36**(7): p. E15.
39. Hipolito, R., et al., *Gastroschisis and Hirschsprung's disease: a rare combination*. Journal of pediatric surgery, 2001. **36**(4): p. 638-40.
40. Lee, T.C., et al., *Gastroschisis and biliary atresia in a neonate: uncommon presentation or common precipitant*. European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery ... [et al] = Zeitschrift fur Kinderchirurgie, 2005. **15**(6): p. 434-6.
41. Verhagen, A.D., *Gastroschisis and congenital contractures: coincidence or syndrome?* Journal of pediatric surgery, 1981. **16**(4 Suppl 1): p. 605-7.
42. Reid, C.O., et al., *Association of amyoplasia with gastroschisis, bowel atresia, and defects of the muscular layer of the trunk*. American journal of medical genetics, 1986. **24**(4): p. 701-10.
43. Robertson, W.L., et al., *Further evidence that arthrogryposis multiplex congenita in the human sometimes is caused by an intrauterine vascular accident*. Teratology, 1992. **45**(4): p. 345-51.
44. Calzolari, E., et al., *Omphalocele and gastroschisis in Europe: a survey of 3 million births 1980-1990*. EUROCAT Working Group. American journal of medical genetics, 1995. **58**(2): p. 187-94.

45. Martinez-Frias, M.L., J.L. Frias, and J. Salvador, *Clinical/epidemiological analysis of malformations*. American journal of medical genetics, 1990. **35**(1): p. 121-5.
46. Goldbaum, G., J. Daling, and S. Milham, *Risk factors for gastroschisis*. Teratology, 1990. **42**(4): p. 397-403.
47. Haddow, J.E., G.E. Palomaki, and M.S. Holman, *Young maternal age and smoking during pregnancy as risk factors for gastroschisis*. Teratology, 1993. **47**(3): p. 225-8.
48. Martinez-Frias, M.L., E. Rodriguez-Pinilla, and L. Prieto, *Prenatal exposure to salicylates and gastroschisis: a case-control study*. Teratology, 1997. **56**(4): p. 241-3.
49. Werler, M.M., J.E. Sheehan, and A.A. Mitchell, *Association of vasoconstrictive exposures with risks of gastroschisis and small intestinal atresia*. Epidemiology, 2003. **14**(3): p. 349-54.
50. Lam, P.K. and C.P. Torfs, *Interaction between maternal smoking and malnutrition in infant risk of gastroschisis*. Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology, 2006. **76**(3): p. 182-6.
51. Werler, M.M., A.A. Mitchell, and S. Shapiro, *First trimester maternal medication use in relation to gastroschisis*. Teratology, 1992. **45**(4): p. 361-7.
52. Torfs, C.P., et al., *Maternal medications and environmental exposures as risk factors for gastroschisis*. Teratology, 1996. **54**(2): p. 84-92.
53. Werler, M.M., A.A. Mitchell, and S. Shapiro, *Demographic, reproductive, medical, and environmental factors in relation to gastroschisis*. Teratology, 1992. **45**(4): p. 353-60.
54. Drongowski, R.A., et al., *Contribution of demographic and environmental factors to the etiology of gastroschisis: a hypothesis*. Fetal diagnosis and therapy, 1991. **6**(1-2): p. 14-27.
55. Morrison, J.J., et al., *Recreational drugs and fetal gastroschisis: maternal hair analysis in the peri-conceptual period and during pregnancy*. BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology, 2005. **112**(8): p. 1022-5.
56. Tan, K.H., et al., *Congenital anterior abdominal wall defects in England and Wales 1987-93: retrospective analysis of OPCS data*. BMJ, 1996. **313**(7062): p. 903-6.
57. Forrester, M.B. and R.D. Merz, *Epidemiology of abdominal wall defects, Hawaii, 1986-1997*. Teratology, 1999. **60**(3): p. 117-23.
58. Kohl, M., A. Wiesel, and F. Schier, *Familial recurrence of gastroschisis: literature review and data from the population-based birth registry "Mainz Model"*. Journal of pediatric surgery, 2010. **45**(9): p. 1907-12.
59. Torfs, C.P., et al., *Selected gene polymorphisms and their interaction with maternal smoking, as risk factors for gastroschisis*. Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology, 2006. **76**(10): p. 723-30.
60. Emanuel, B.S., *Molecular cytogenetics: toward dissection of the contiguous gene syndromes*. American journal of human genetics, 1988. **43**(5): p. 575-8.
61. Schmickel, R.D., *Contiguous gene syndromes: a component of recognizable syndromes*. The Journal of pediatrics, 1986. **109**(2): p. 231-41.
62. Veltman, J.A. and H.G. Brunner, *Understanding variable expressivity in microdeletion syndromes*. Nature genetics, 2010. **42**(3): p. 192-3.
63. Malcolm, S., *Microdeletion and microduplication syndromes*. Prenatal diagnosis, 1996. **16**(13): p. 1213-9.
64. van Ravenswaaij-Arts, C.M. and T. Kleefstra, *Emerging microdeletion and microduplication syndromes; the counseling paradigm*. European journal of medical genetics, 2009. **52**(2-3): p. 75-6.
65. Berg, J.S., L. Potocki, and C.A. Bacino, *Common recurrent microduplication syndromes: diagnosis and management in clinical practice*. American journal of medical genetics. Part A, 2010. **152A**(5): p. 1066-78.
66. Scriver, C.R., *The metabolic & molecular bases of inherited disease*. 8th ed2001, New York: McGraw-Hill.

67. Shaffer, L.G., *Diagnosis of microdeletion syndromes by fluorescence in situ hybridization (FISH)*. Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L. Haines ... [et al.], 2001. **Chapter 8**: p. Unit 8 10.
68. Shaffer, L.G. and B.A. Bejjani, *A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays*. Human reproduction update, 2004. **10**(3): p. 221-6.
69. Kallioniemi, A., et al., *Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors*. Science, 1992. **258**(5083): p. 818-21.
70. Lapierre, J.M., et al., *Analysis of uncultured amniocytes by comparative genomic hybridization: a prospective prenatal study*. Prenatal diagnosis, 2000. **20**(2): p. 123-31.
71. Johnston, J.J., et al., *Zoom-in comparative genomic hybridisation arrays for the characterisation of variable breakpoint contiguous gene syndromes*. Journal of medical genetics, 2007. **44**(1): p. e59.
72. Thompson, B.A., et al., *CHD8 is an ATP-dependent chromatin remodeling factor that regulates beta-catenin target genes*. Molecular and cellular biology, 2008. **28**(12): p. 3894-904.
73. Yuan, C.C., et al., *CHD8 associates with human Staf and contributes to efficient U6 RNA polymerase III transcription*. Molecular and cellular biology, 2007. **27**(24): p. 8729-38.
74. Rodriguez-Paredes, M., et al., *The chromatin remodeling factor CHD8 interacts with elongating RNA polymerase II and controls expression of the cyclin E2 gene*. Nucleic acids research, 2009. **37**(8): p. 2449-60.
75. Batsukh, T., et al., *CHD8 interacts with CHD7, a protein which is mutated in CHARGE syndrome*. Human molecular genetics, 2010. **19**(14): p. 2858-66.
76. Rodenberg, J.M., et al., *Regulation of serum response factor activity and smooth muscle cell apoptosis by chromodomain helicase DNA-binding protein 8*. American journal of physiology. Cell physiology, 2010. **299**(5): p. C1058-67.
77. Nishiyama, M., et al., *CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis through histone H1 recruitment during early embryogenesis*. Nature cell biology, 2009. **11**(2): p. 172-82.
78. Heyer, B.S., et al., *Hypersensitivity to DNA damage leads to increased apoptosis during early mouse development*. Genes & development, 2000. **14**(16): p. 2072-84.
79. Armstrong, J.F., et al., *High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice*. Current biology : CB, 1995. **5**(8): p. 931-6.
80. Nicol, C.J., et al., *A teratologic suppressor role for p53 in benzo[a]pyrene-treated transgenic p53-deficient mice*. Nature genetics, 1995. **10**(2): p. 181-7.
81. Goytisolo, F.A., et al., *Short telomeres result in organismal hypersensitivity to ionizing radiation in mammals*. The Journal of experimental medicine, 2000. **192**(11): p. 1625-36.
82. Bekaert, S., et al., *Telomere shortening is associated with malformation in p53-deficient mice after irradiation during specific stages of development*. DNA repair, 2005. **4**(9): p. 1028-37.